

EP 44628 (1)



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 101 57 128 A 1**

(51) Int. Cl. 7:
G 01 N 33/483
G 01 N 27/64
C 12 Q 1/04
C 12 Q 1/70

(21) Aktenzeichen: 101 57 128.3
(22) Anmeldetag: 13. 11. 2001
(43) Offenlegungstag: 22. 5. 2003

(71) Anmelder:

Laser- und Medizin- Technologie GmbH, 14195
Berlin, DE; IUT Institut für Umwelttechnologien
GmbH, 12489 Berlin, DE

(72) Erfinder:

Leonhard, Jürgen, Prof., 10179 Berlin, DE; Müller,
Gerhard, Prof. Dr.-Ing., 14129 Berlin, DE; Katzung,
Walter, Dr., 10117 Berlin, DE; Bindig, Uwe, Dr.,
14167 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- (54) Verfahren und Vorrichtung zum gezielten und spezifischen Nachweis bakterieller Sporen
(55) Die Erfindung betrifft ein Echtzeitverfahren zum Schnelltest auf bakterielle Kontaminanten. Durch eine Kombination von pyrolytischem Aufschluß, Kapillartrennungsverfahren und Ionen-Mobilitäts-spektrometrie wird eine biochemische repräsentative Signatur der bakteriellen Kontamination gemessen. Neben der prinzipiellen Detektion einer Belastung der Raum/Umgebungsluft kann auch eine direkte Kontrolle in der Ausatemluft von Personen erfolgen.

DE 101 57 128 A 1

DE 101 57 128 A 1

Beschreibung

Aufgabenstellung

[0001] Sporen werden von einigen Gram-positiven Bakterien in Reaktion auf bestimmte Reize gebildet. Sporen stellen aufgrund ihrer Konstitution langlebige Bioobjekte dar. Diese ermöglichen das Überleben einer Spezies selbst unter widrigen Bedingungen, stellen jedoch als pathogene Bakterien für die Gesundheit der Menschen eine dauerhafte Gefahrenquelle dar.

[0002] Die konventionelle mikrobiologische Diagnostik im Labor ist schwierig und erfolgt über Aktivierung, Anzüchtung und Ansäbeverfahren. Diese Methoden sind personal- und zeitaufwendig, kostenintensiv und unterliegen einer subjektiven Beurteilung. Ein neues Lichtzeitverfahren soll hierzu für den schnellen Nachweis von Sporen ermöglichen.

Stand der Technik

[0003] Sporen stellen eine langzeitstabile und erneut reaktivierbare biologische Erscheinungsform der Keimzellen definierter Mikroorganismen dar. Nach dem Ursprung wird in bakterielle oder nichtbakterielle Sporen unterschieden. Extreme Umweltbedingungen oder andere ungünstige Verhältnisse (fehlende Nährstoffe, Anhäufung von Stoffwechselprodukten) stellen die Ursache für die Bildung bakterieller Sporen dar. Auf Basis von Veränderungen im Metabolismus, der Stoffumwandlung durch Verwertung von Depotsubstanzen wird als sporenspezifische Substanz vermehrt Dipicolinsäure synthetisiert. Die Reduktion des zellulären Wassergehaltes, die Bildung langlebiger chemischer Substanzen und durch physikalische Prozesse verändert sich die morphologische Struktur der Keimzelle. Polyterpene bzw. Polypeptide stellen u. a. den Hauptbestandteil der Zellwandsubstanzen von Sporen dar. Die multischichtige Umhüllung der Spore kann bis zu 50% der Trockenmasse betragen. Reife Endosporen lassen keine Stoffwechselaktivität erkennen und verfügen über einen hohen Grad von Resistenz gegenüber thermischer, chemischer oder strahlungsbedingter Exposition. Für eine Keimung der Sporen ist nicht nur die Quellung durch Wasser essentiell sondern häufig auch eine Lichtinduktion erforderlich.

[0004] Speziell zur Gefahrenabwehr ist eine dauerhafte Überwachung sensitiver Bereiche unabdingbar, da ein hohes Gefährdungspotential gegeben ist. Zum Nachweis luftgetragener Kontaminationen müssen i. d. R. zeitaufwendige, mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt werden.

[0005] In der Anforderung an die neue Technologie soll neben einer tragbaren Apparatur auch eine einfache Handhabung sichergestellt sein. Derzeit sind Methoden zur direkten Detektion ohne Zeitverlust zwischen Probenahme und Messergebnis nicht bekannt. Als Verfahren werden neben einfachen Transmissions- und Reflexionsmessungen, Pyrolyse mit Gaschromatographischer Trennung und IMS-Detektion, Massenspektroskopische Verfahren wie MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight spectrometry), auto/fluoreszenzoptische Verfahren, molekularbiologische Methoden (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assays und auf PCR (Polymerase chain reaction)) beruhende Verfahren angegeben. Verfahren die zur Charakterisierung als Parameter lediglich die Partikelverteilung anhand von Durchmesser und Partikelform verwenden haben sich für die Analyse und den Nachweis aus komplexen Bioaerosolen nicht bewährt. Alle diese Verfahren bedingen einen hohen apparativen Aufwand und verlangen vom Anwender detailliertes Spezialwissen oder weisen eine zu

geringe Sensitivität und Selektivität auf. Eine direkte Messung ohne größeren Zeitverlust ist somit nicht möglich. Dies hat für eine korrekte Diagnosestellung und Einleitung entsprechender Gegenmaßnahmen fatale Folgen.

Erfundungsgemäß Lösung

[0006] Erfundungsgemäß sollen Beispielhaft anhand der Sporen der Gattung *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus anthracis* die Charakterisierung in luftgetragenen Bio/Aerosolen mittels verschiedener Messprinzipien, die alle erfundungsgegenständlich sind, erfolgen.

[0007] Erfundungsgemäß erfolgt nach der Probenvorbereitung ein Probenaufschluss. Bestandteil des Aufschlussmechanismus ist die photothermische Pyrolyse unter Verwendung geeigneter Vorrichtungen. Als Vorrichtung wird eine Kapillare verwendet. Diese Hohlspitze/Kapillare besteht z. B. aus Saphirmaterial. Neben der Funktion innerhalb des Aufschlussmechanismus erfolgt synchron die Verwendung

20 für einen Trennungsmechanismus. Im bevorzugten Ausführungsbeispiel ist der Durchmesser und die Größe der Saphirkapillare der spezifischen Messaufgabe angepasst. Eine Beladung der inneren Oberfläche u/o. eine Dotierung mit geeigneten Materialien ist in Weiterführung des Erfundungsgedankens vorgesehen.

[0008] In dem bevorzugten Ausführungsbeispiel kommt es innerhalb der Hohlkapillare aufgrund von Diffusion und Konvektion zu Auftrennungseffekten an der modifizierten Kapillarinnenwand, welches eine gezielte Detektion ermöglicht.

[0009] Erfundungsgemäß erfolgt die Pyrolyse durch Interaktion der u. a. mit Sporen belasteten Gasphase mit einem Laserstrahl definierter Leistungseigenschaften und Wellenlängen. In dem bevorzugten Ausführungsbeispiel wird als Laser z. B. ein CO₂-Laser verwendet. Die Ankopplung der Energie erfolgt durch Strahlungsabsorption im Wellenlängenbereich von ca. 9–11 μm. Für den Energietransfer werden organische Verbindungen der Sporen in-situ genutzt. In Fortführung des Erfundungsgedanken eignen sich für die 30 Anwendung auch andere Laser im Spektralbereich 0,15 μm–15 μm.

[0010] In einem weiterem Ausführungsbeispiel erfolgt die Pyrolyse der Sporen an katalytischen Oberflächen wie z. B. thermisch aufgeheizten Platinnetzen; Bevorzugt jedoch oder 45 katalytisch dotierten/beschichteten Kapillaren und Kapillarbündeln. Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass bei der pyrolytischen Zersetzung des u. a. mit Sporen kontaminierten Aerosols charakteristische Fragmente der beispielhaft genannten Sporen entstehen. In dem bevorzugten Ausführungsbeispiel werden diese volatilen Komponenten mess-technisch spezifisch nachgewiesen, wobei in einem erfundungswesentlichen Schritt ein Ionen-Drift-Sensor nach dem Stand der Technik verwendet wurde. In einem weiteren erfundungswesentlichen Schritt erfolgte der Nachweis dieser 50 Pyrolysefragmente mit laserspektroskopischen Methoden.

In Weiterführung des Erfundungsgedankens wurden derartige Kapillaren/Kapillarbündel mit Methoden der Sol-Gel-Technik beschichtet und überraschenderweise konnten mit speziellen stabilen molekularen Sensitzern über Fluoreszenzanregung oder Quenchingschritte Bestandteile der Sporen unmittelbar nachgewiesen werden. In Weiterführung des Erfundungsgedankens ist im Vorfeld zur effektiven Kondensation partikulärer Bestandteile des Aerosols – d. h. Konzentrierung – durch die Zugabe von Gasen wie z. B. von Wasserdampf auf Oberflächen vorgesehen.

[0011] Erfundungsgemäß erfolgt die Detektion der Laserpyrolyseprodukte mittels eines höchstempfindlichen Ionen-Drift-Detektors der Firma I. U. T./Berlin. Merkmal des De-

tektors/Sensors sind die Ionisierung der volatiblen chemischen Pyrolyseprodukte mittels Tritium. Des weiteren ermöglicht die kapazitive Beschleunigungsstrecke für die Ionen in der Gasphase bei Normaldruck eine höchstsensitive Erfassung. Über chemometrische Auswerteprogramme erfolgte die Zuordnung der erfassten spektroskopischen Daten. Eine der in Fortführung des Erfindungsgedanken nachzuweisenden Leitkomponenten aus der pyrolytischen Zersetzung der Sporen (Taxonomie) sind u. a. Fragmente und/oder Reaktionsprodukte von bio-organischen Verbindungen (hochmolekulare Terpene, Picolinsäure und Lipide sowie deren Kondensations- und Reaktionsprodukte).

[0012] Erfindungsrelevant ist des weiteren die Gewährleistung der Temperaturstabilität im Bezug auf konstante Pyrolysebedingungen in Hinblick auf die Reproduzierbarkeit des Verfahrens. Im bevorzugten Ausführungsbeispiel ist mit Blick auf Arbeitshygiene und Desinfektion die Gewährleistung der vollständigen Eliminierung bakterieller pathogener Erreger oder luftgetragener Sporen u. a. in der Hohlfaser/Kapillararray durch den Reinigungseffekt eines hochenergetischen Laserstrahls gegeben.

[0013] Im Bio/Aerosol sind zeitgleich diverse bakterielle Mikroorganismen der Umgebungsluft (Belastung mit Pilzen, Pollen etc.) enthalten, deren Konzentration/Volumen konnte überraschenderweise infolge einer Vorreinigung zugunsten des Analyten reduziert werden. Neben der prinzipiellen Detektion einer Belastung der Raum/Umgebungsluft ist Gegenstand der Erfindung die direkte Kontrolle in der Ausatemluft kontaminierten und nicht-kontaminierten Personen (Alveolar positive/negativ) gegenüber einer Hintergrundbelastung.

[0014] In Fortführung des Erfindungsgedanken ist in einem zusätzlichen erfindungsrelevanten Verfahrensschritt die Aufkonzentrierung der Sporenpyrolyseprodukte zum Zwecke der Detektion vorgesehen.

[0015] In dem bevorzugten Ausführungsbeispiel erfolgt die Stoffstromführung im Gegenstrom zur Laserstrahleinkopplung, in Weiterführung des Erfindungsgedankens sind weitere technische Lösungen vorgesehen.

[0016] In Fortführung des Erfindungsgedanken ist ebenso eine Detektion von Kontaminationen mit viralen Erregern, den Bakteriophagen - wobei Viren aus DNA/RNA-Anteilen und einer Proteinhülle bestehen Beispielhaft anhand von Pockenviren durchgeführt, möglich.

[0017] Die Erfindung ist in den Abb. 1-7 erläutert:

[0018] Abb. 1 Kapillare/Hohlfaser und Kapillarbündel/array

[0019] Abb. 2 Laserstrahlführung und Stoffstrom erfolgt in gleicher Richtung (Gleichstromverfahren). Vorrichtung mit einer Kapillare oder Kapillarbündel

[0020] Abb. 3 Laserstrahlführung und Stoffstrom in gleicher Richtung (Gleichstromverfahren). Vorrichtung mit Einzelkapillare (6.), der Laserstrahl wird seitlich eingekoppelt (3.), externe Laserleistungsmessung (4.b), nach Pyrolyse in 6. erfolgt die IMS-Detektion (8).

[0021] Abb. 4 Laserstrahlführung und Stoffstrom in gleicher Richtung (Gleichstromverfahren). Vorrichtung mit Kapillarbündel/array (6.), der Laserstrahl wird seitlich eingekoppelt (3.), externe Laserleistungsmessung (4.b), nach synchroner Pyrolyse in 6. erfolgt die IMS-Detektion (8).

[0022] Abb. 5 Laserstrahlführung und Stoffstrom in gleicher Richtung (Gleichstromverfahren). Vorrichtung mit Kapillarbündel/array (6.), der Laserstrahl wird seitlich eingekoppelt (3.), externe Laserleistungsmessung (4.b), nach Pyrolyse in der ersten Kapillare, werden unterschiedlich dotierte Kapillaren zur Auftrennung verwendet, dann erfolgt die IMS-Detektion (8).

[0023] Abb. 6 Laserstrahlführung und Stoffstrom in glei-

cher Richtung (Gleichstromverfahren). Vorrichtung mit austauschbaren, individuell dotierten Einzelkapillaren (6.), durch Dreh- oder in Form einer Verschiebeeinheit kann die Position der Kapillaren verändert werden. Der Laserstrahl wird seitlich eingekoppelt (3.), externe Laserleistungsmessung (4.b), nach Pyrolyse in 6. erfolgt die separate IMS-Detektion (8) für jede Einzelkapillare.

[0024] Abb. 7 Laserstrahlführung und Stoffstrom in entgegengesetzter Richtung (Gegenstromverfahren). Vorrichtung mit austauschbaren, individuell dotierten Einzelkapillaren (6.), durch Dreh- oder in Form einer Verschiebeeinheit kann die Position der Kapillaren verändert werden. Der Laserstrahl wird seitlich eingekoppelt (3.), externe Laserleistungsmessung (4.b), nach Pyrolyse in 6. erfolgt die separate IMS-Detektion (8) für jede Einzelkapillare.

Patentansprüche

1. Verfahren und Vorrichtung zum Schnelltest auf bakterielle Kontaminanten dadurch gekennzeichnet, dass durch eine Kombination von pyrolytischem Aufschluß, Kapillartrennungsverfahren und Ionen-Mobilitäts-Spektrometrie eine biochemische repräsentative Signatur der bakteriellen Kontamination gemessen wird.

2. Verfahren und Vorrichtung nach 1, dadurch gekennzeichnet, dass Laserstrahlung im spektralen Bereich von 0,15-15 µm zur Pyrolyse verwendet wird.

3. Verfahren und Vorrichtung nach 1, dadurch gekennzeichnet, dass in dem bevorzugten Ausführungsbeispiel ein CO₂-Laser verwendet wird.

4. Verfahren und Vorrichtung nach 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Excimer-Laser (Xenonchlorid 308 nm) eingesetzt wird.

5. Verfahren und Vorrichtung nach 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein inneres Platinnetz zur inneren Pyrolyse verwendet wird.

6. Verfahren und Vorrichtung nach 1, dadurch gekennzeichnet, dass die schnelle Aufheizung des Probenvolumen mit einem Laser erfolgt.

7. Verfahren und Vorrichtung nach 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Einkopplungselement in Verbindung mit dem Ionen-Drift-Sensor steht.

8. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Einkopplungselement eine Trennstruktur enthalten ist.

9. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass zur Laserstrahlführung eine beschichtete Kapillare verwendet wird.

10. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass der pyrolytische Aufschluss innerhalb der Kapillare erfolgt.

11. Verfahren und Vorrichtung nach 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Pyrolyse bakterieller Kontaminanten vor der Ionisierung erfolgt.

12. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass ein besonderes Kopplungs-glied zur Laserstrahlführung eingesetzt wird.

13. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass in dem bevorzugten Ausführungsbeispiel die Stoffstromführung entgegengesetzt zur Laserstrahlführung erfolgt.

14. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass ein konstanter Luftstrom über die Kopplungsstrecke geführt wird.

15. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass eine Hohlfaser/Kapillare deren innere Oberfläche modifiziert und der Messaufgabe angepasst werden kann genutzt wird.

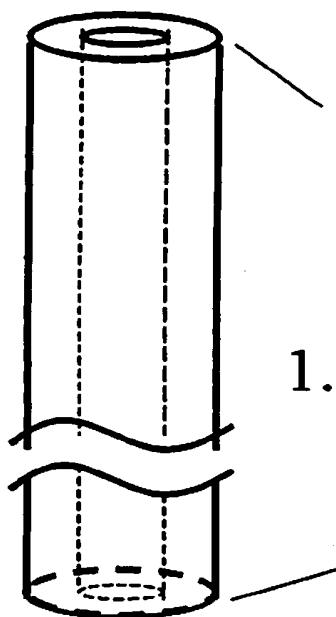
16. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass die Hohlfaser/Kapillare(n) aus Siliziummaterial sind.
17. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass ein Kapillarbündel Anwendung findet.
18. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass die Hohlfaser/Kapillare(n) in ihrer geometrischen Form der spezifischen Messaufgabe angepasst werden.
19. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass für die Gesamtlänge der Hohlfaser/Kapillare(n) eine Temperaturanfälligkeit durch die Laserpyrolyse erzielt wird.
20. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass die Pyrolyse in einer Kapillare erfolgt und die verbliebenen Kapillaren des Kapillarbündels gleich oder unterschiedlich beschichtet oder in Teil-Segmenten für die Trennung Abwendung finden.
21. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass Hohlfaser/Kapillarbündel als Auf trennungseinheit dienen.
22. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass die innere Oberfläche der Hohlfaser/Kapillare(n) durch Dotierung/Belegung aktiviert wird.
23. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass durch eine aktivierte Oberfläche der Hohlfaser/Kapillare(n) Trennungseffekte verzielt werden.
24. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass ein Kapillarbündel im Sinne einer Revolverschaltung – wobei auch andere technische Lösung erfindungsgemäß sind – über ein Kopplungsglied in dem bevorzugten Ausführungsbeispiel mit der Möglichkeit der separaten externen Leistungsmessung mit dem Sensor gekoppelt ist.
25. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass die Reinigung der Hohlfaser/Kapillare(n) durch den Laserstrahl erzielt wird.
26. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass eine Anreicherung von Kontaminanten durch geeignete Filtersysteme erreicht wird.
27. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass die Anreicherung von Kontaminationspyrolyseprodukte eine Steigerung der höchstsensitiven Detektion ermöglicht.
28. Verfahren und Vorrichtung nach 1, 2-6 und 7-27, dadurch gekennzeichnet, dass ein hochsensitiver Ionen-Drift-Sensor der Firma I. U. T. zur Detektion verwendet wird.
29. Verfahren und Vorrichtung nach 1, 2-6 und 7-27, dadurch gekennzeichnet, dass Glas für eine Kondensation partikulärer Bestandteile aus der Umgebungsluft genutzt wird.
30. Verfahren und Vorrichtung nach 1, 2-6 und 7-27, dadurch gekennzeichnet, dass als Gas zur Kondensation Wasserdampf Anwendung findet.
31. Verfahren und Vorrichtung nach 1, 2-6, 7-27, dadurch gekennzeichnet, dass ein inertes Gas zur Pyrolyse hinzugesetzt wird.
32. Verfahren und Vorrichtung nach 1, 2-6, 7-27, dadurch gekennzeichnet, dass ein gasförmiger Reaktant hinzugefügt wird.
33. Verfahren und Vorrichtung nach 1, 2-6, 7-27, dadurch gekennzeichnet, dass als Kopplungselement eine

Minaturisierung der Detektoreinheit als IMS-Chip im Rahmen der Mikrosystemtechnik angestrebt wird.

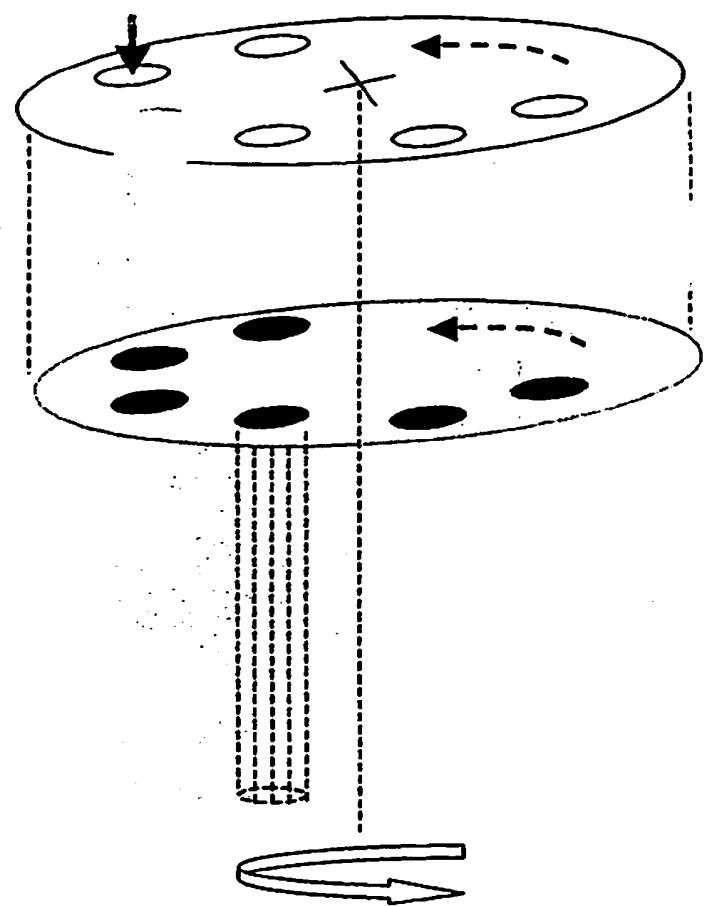
34. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass als Kontaminanten Bakteriophagen z. B. Pockenviren in dem gasförmigen Stoffstrom nachweisbar sind.

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -



1. Kapillare/Hohlfaser



2. Kapillarbündel/Array, im Block oder Gestell
die Kapillaren sind Einzeln austauschbar

Abb.1

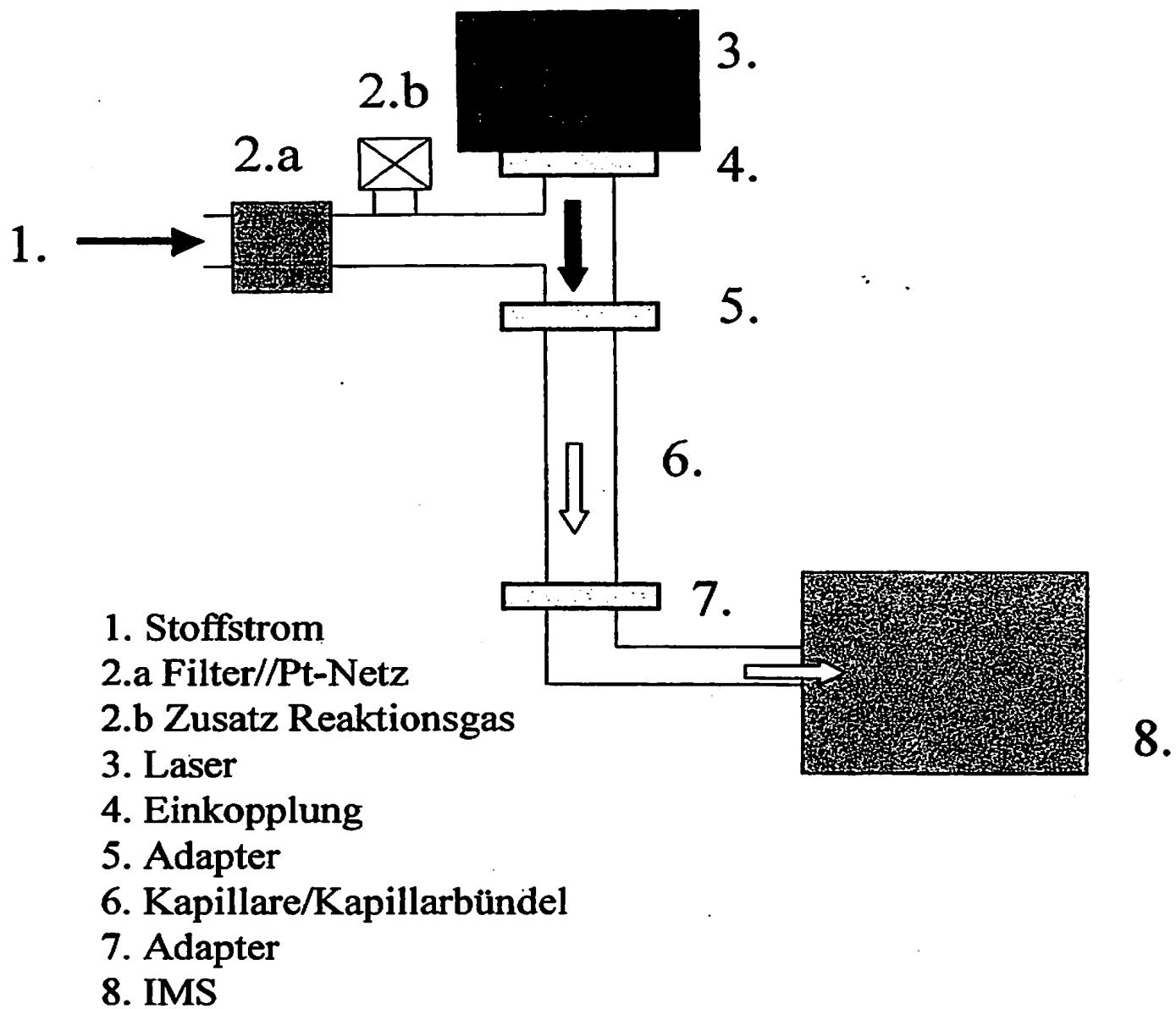
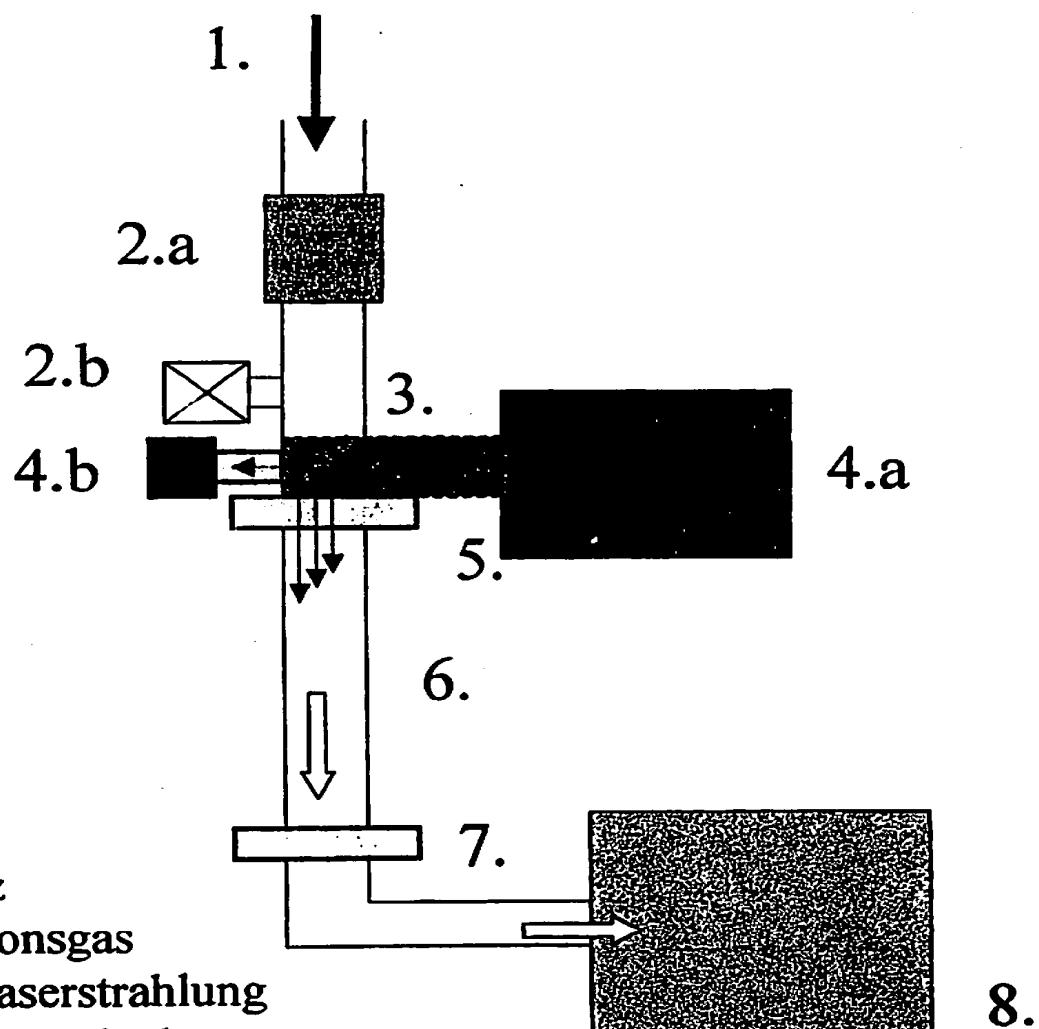


Abb.2



1. Stoffstrom

2.a Filter//Pt-Netz

2.b Zusatz Reaktionsgas

3. Einkopplung Laserstrahlung
über perforiertem Umlenk-
spiegel/filter

4.a Laser

4.b externer Leistungsmesser

5. Adapter

6. Kapillare/Kapillarbündel

7. Adapter

8. IMS

Abb.3

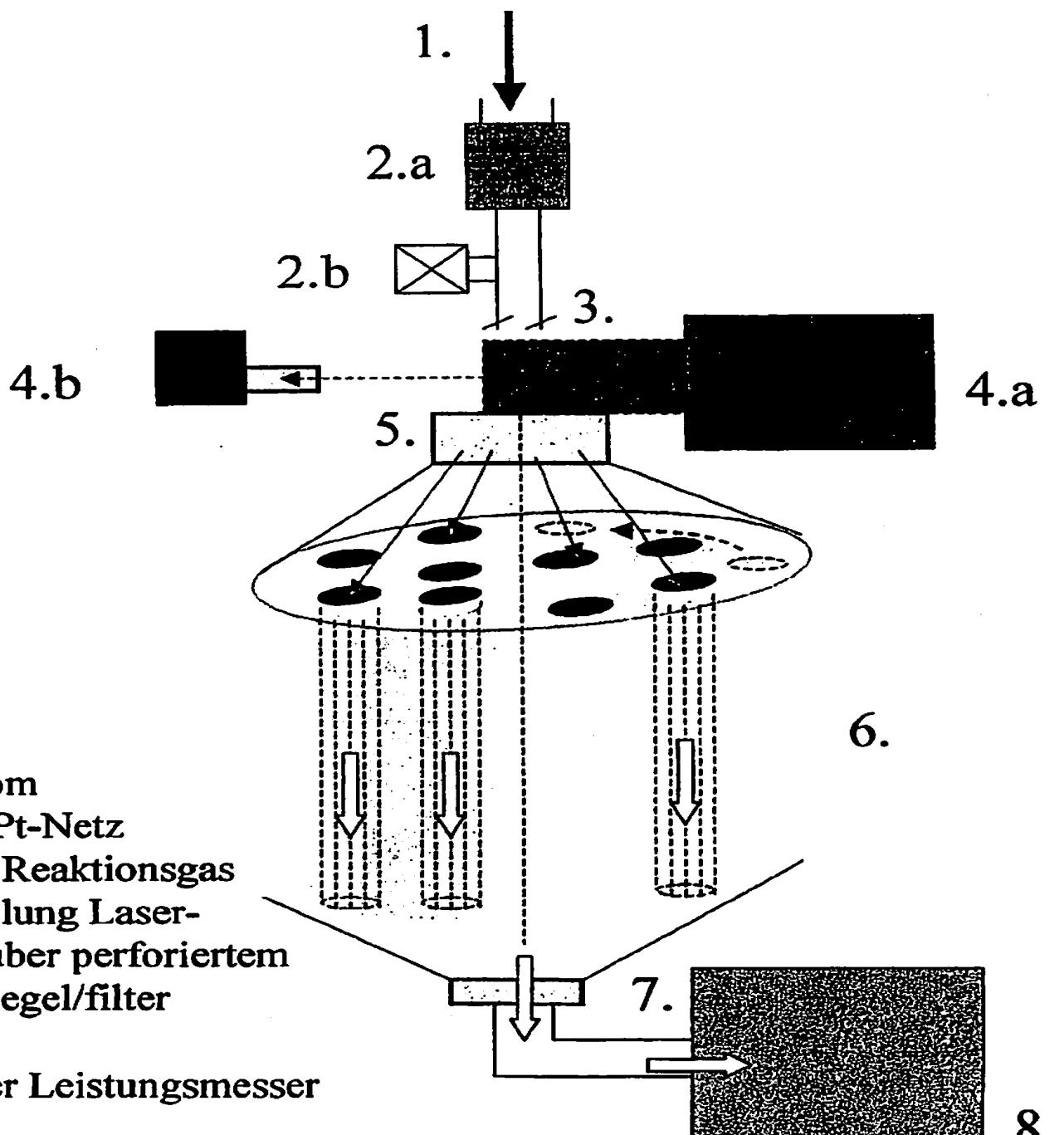


Abb.4

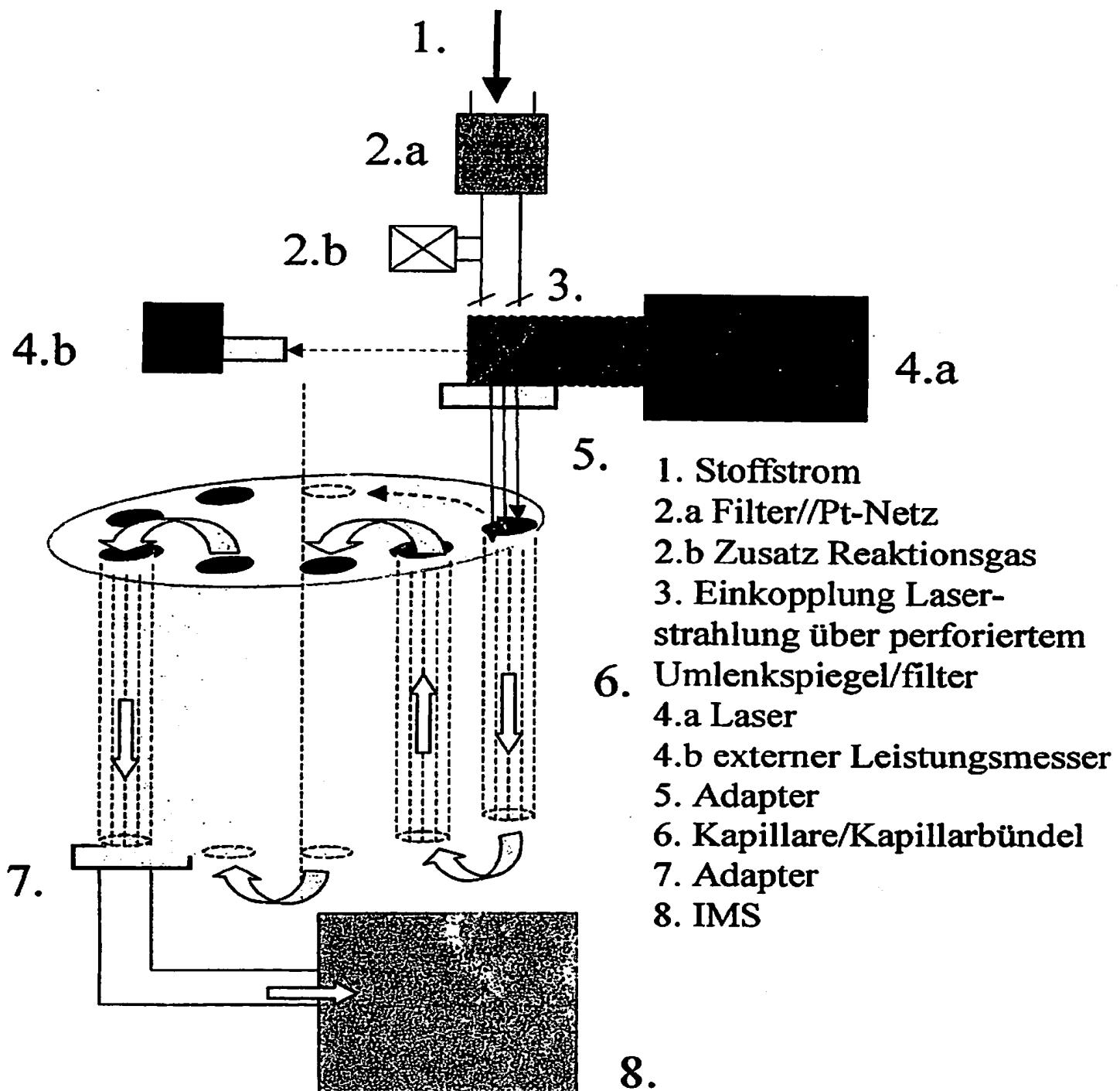


Abb.5

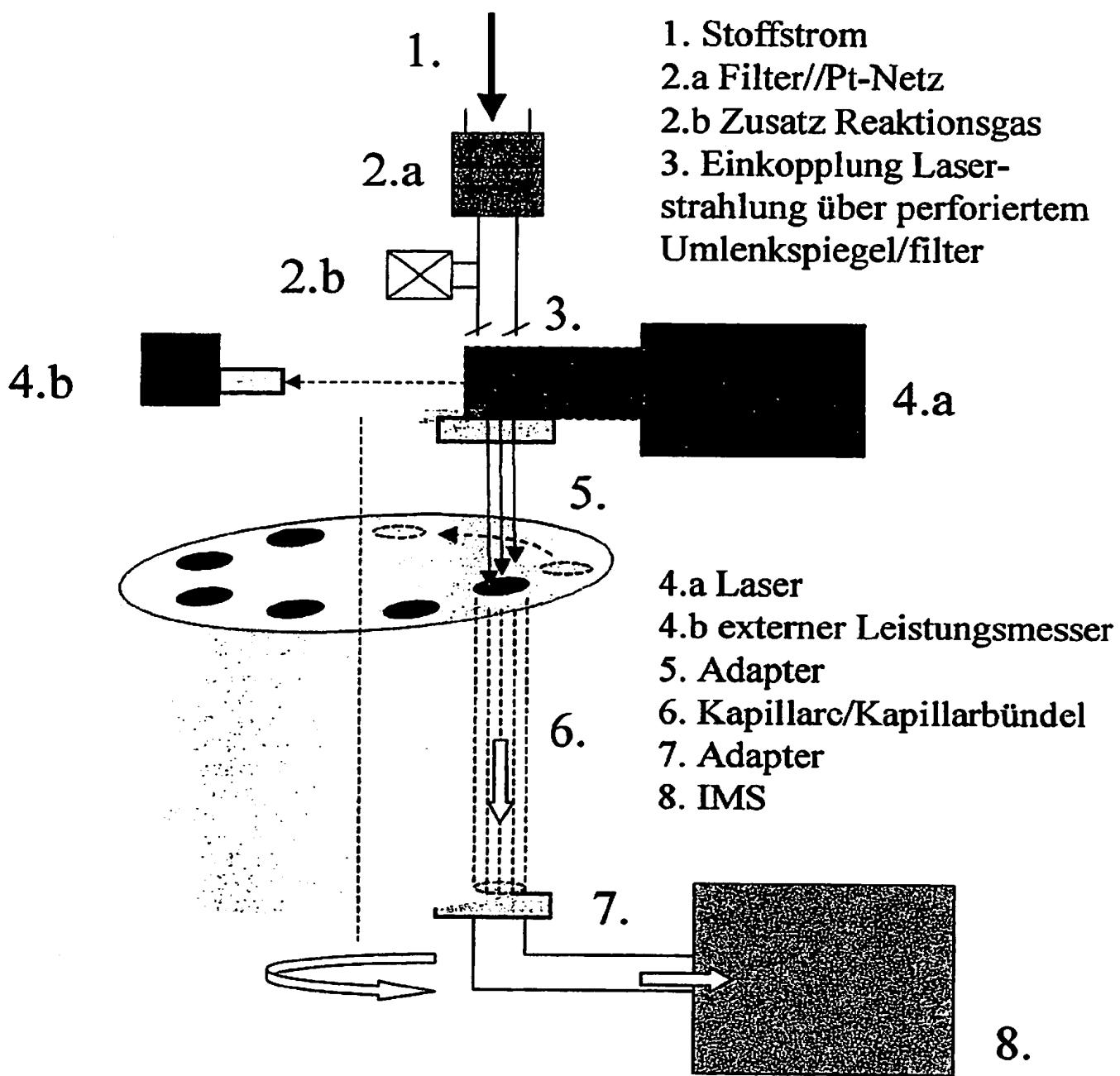


Abb.6

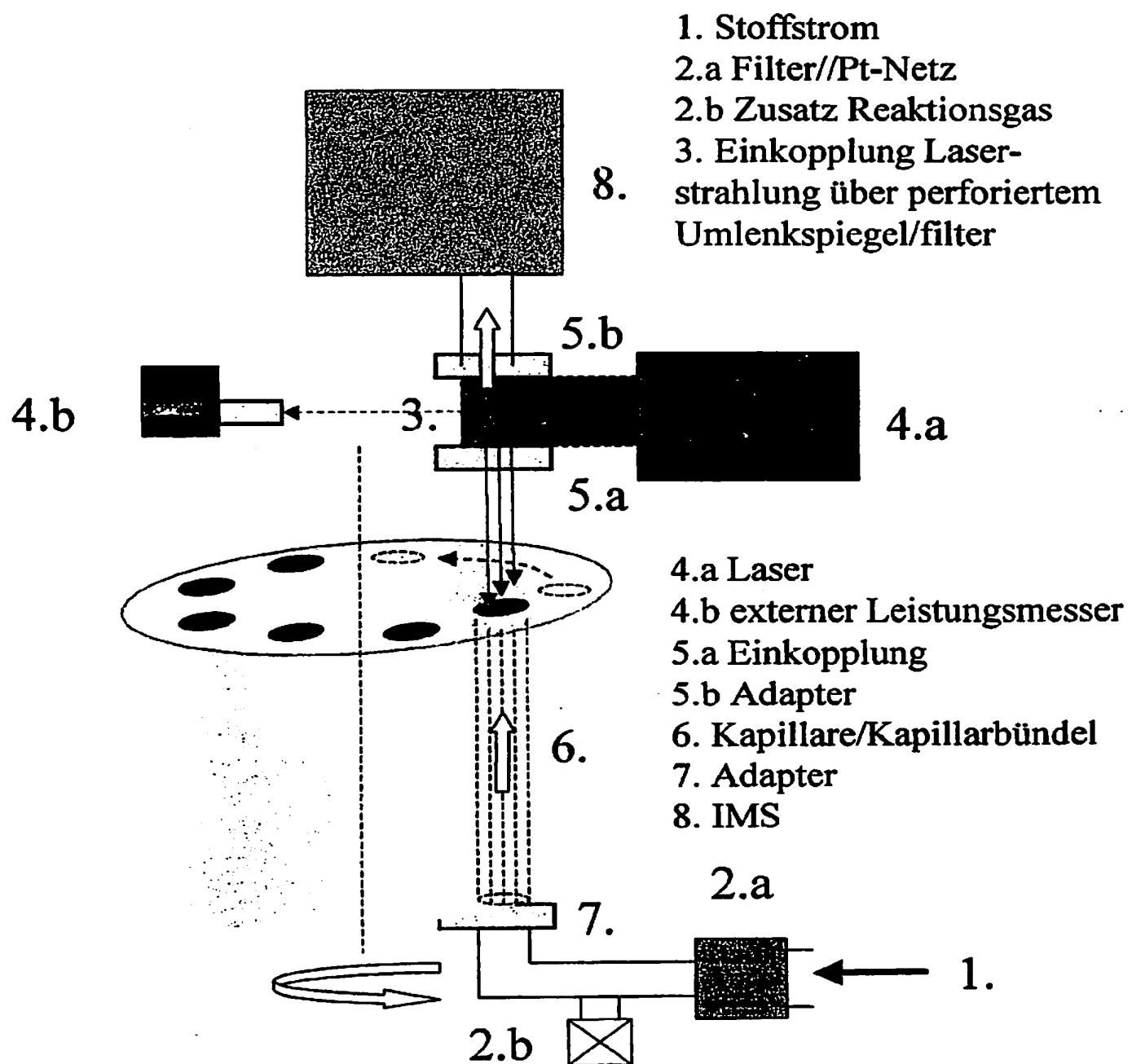


Abb.7